

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/KR04/003546

International filing date: 30 December 2004 (30.12.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: KR
Number: 10-2003-0099556
Filing date: 30 December 2003 (30.12.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 14 February 2005 (14.02.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse



**This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office.**

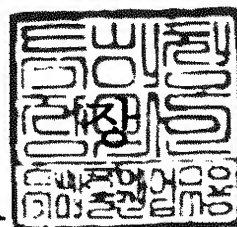
출 원 번 호 : 특허출원 2003년 제 0099556 호
Application Number 10-2003-0099556

출 원 년 월 일 : 2003년 12월 30일
Date of Application DEC 30, 2003

출 원 인 : 주식회사 엠디바이오알파
Applicant(s) MD Bioalpha

2005 년 1 월 14 일

특 허 청
COMMISSIONER



【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【참조번호】	0027
【제출일자】	2003.12.30
【국제특허분류】	A61K
【발명의 명칭】	크립토탄시논을 유효성분으로 함유하는 비만 예방 및 치료 조성물
【발명의 영문명칭】	obesity treatment with cryptotanshinone
【출원인】	
【명칭】	주식회사 엠디바이오알파
【출원인 코드】	1-2002-014727-9
【발명자】	
【성명의 국문표기】	박명규
【성명의 영문표기】	PARK, Myunggyu
【주민등록번호】	601102-1260415
【우편번호】	449-906
【주소】	경기도 용인시 기흥읍 서천리 Sk서그네마을APT 107동 302호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	김은주
【성명의 영문표기】	KIM, Eun Ju
【주민등록번호】	760129-2117416
【우편번호】	462-242
【주소】	경기도 성남시 중원구 금광2동 3168 201호
【국적】	KR
【취지】	특허법 제42조의 규정에 의하여 위와 같이 출원합니다. 출원인 주식회사 엠디바이오알파 (인)
【수수료】	
【기본출원료】	20 면 29,000 원
【가산출원료】	21 면 21,000 원

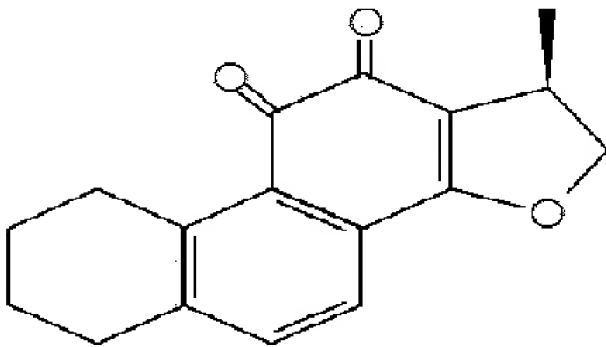
【우선권 주장료】	0	건	0	원
【심사청구료】	0	항	0	원
【합계】	50,000	원		
【감면사유】	중소기업			
【감면 후 수수료】	25,000	원		
【첨부서류】	1. 중소기업기본법시행령 제2조에 의한 중소기업에 해당함을 증명하는 서류_1통			

【요약서】

【요약】

본 발명은 크립토탄시논을 유효성분으로 함유하는 비만 예방 및 치료 조성물에 관한 것으로 더욱 상세하게는 지방세포 (3T3-L1 과 F442A cell) 분화 억제에 대해 우수한 활성을 나타내는 다음 화학식 1로 표시되는 크립토탄시논 (cryptotanshinone)을 유효 성분으로 함유하는 비만 예방 및 치료 조성물에 관한 것이다.

화학식 1



【대표도】

도 1

【색인어】

지방세포 (3T3-L1 cell) 분화 저해, 비만예방 및 치료

【명세서】

【발명의 명칭】

크립토탄시논을 유효성분으로 함유하는 비만 예방 및 치료 조성물 {obesity treatment with cryptotanshinone}

【도면의 간단한 설명】

도 1는 단삼 추출물과 크립토탄시논을 지방세포인 3T3-L1 세포주에 처리하여 지방세포의 분화가 저해된 차이를 보여주는 사진이다.

도 2는 단삼 추출물과 크립토탄시논을 지방세포인 3T3-L1 세포주에 처리하여 세포독성이 없음을 보여주는 그래프이다.

도 3는 크립토탄시논을 비만 모델 동물인 성숙한 *DIO* (Diet Induced Obesity) 마우스에 4주간 투여한 후 체중이 감소한 (비만예방 및 치료) 실험군과 대조군의 차이를 비교한 그래프이다.

【발명의 상세한 설명】

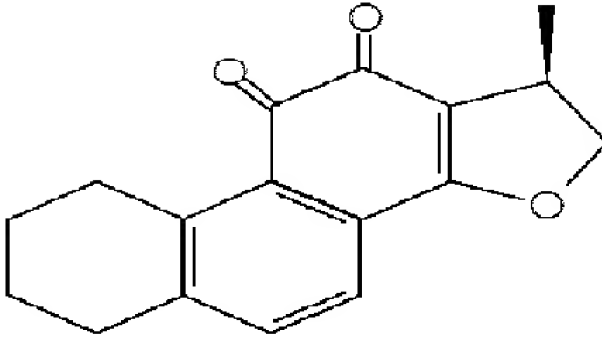
【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

<4> 본 발명은 크립토탄시논 (cryptotanshinone) 을 유효성분으로 함유하는 비만 예방 및 치료제 조성물에 관한 것으로 더욱 상세하게는 지방세포 (3T3-L1 과 F442A cell) 분화 억제에 대해 우수한 활성을 나타내는 다음 화학식 1로 표시되는 크립토탄시논 (cryptotanshinone) 을 유효성분으로 함유하는 비만 예방 및 치료제 조성물에 관한 것이다.

<5> 화학식 1

<6>



<7> 최근 경제발전에 따른 생활수준의 향상으로 인하여 위생환경이 개선되고 잦은 인스턴트 음식물 섭취와 육식위주의 식생활 변화 등은 과다한 열량의 섭취를 유발한다.

그러나, 이러한 현대인의 식생활 변화는 턱없이 부족한 운동부족 등으로 인하여 소모 열량이 적기 때문에 빠른 비만인구의 증가경향을 보이고 있다. 비만은 단순히 외형상의 문제 뿐 만 아니라 비만이 지속됨으로써 여러 가지 질환, 즉, 고혈압, 당뇨, 고지혈증, 관상동맥질환 등과 같은 성인성 질병을 비롯하여 유방암, 자궁암 및 대장암 등을 야기하는 것으로 보고되면서 이제는 치명적인 질병 중 하나로 취급되고 있다 [J. Biol. Chem., 273, 32487 ~ 32490 (1998); Nature, 404, 652 ~ 660 (2000)].

<8> 현재 비만을 치료하는 치료제로는 크게 중추 신경계에 작용하여 식욕에 영향을 주는 약제와 위장관에 작용하여 흡수를 저해하는 약물로 나누어 볼 수 있다. 중추 신경계에 작용하는 약물로는 각각의 기전에 따라 세로토닌 (5HT) 신경계를 저해하는 펜플루라민, 텍스펜플루라민 등의 약물, 노르아드레날린 신경계를 통한 에페드린 및 카페

인 등의 약물 및 최근에는 세로토닌 및 노르아드레날린 신경계에 동시 작용하여 비만을 저해하는 시부트라민 등의 약물들이 시판되고 있다.

<9> 이외에도, 위장관에 작용하여 비만을 저해하는 약물로는 대표적으로 췌장에서 생성되는 리파제를 저해하여 지방의 흡수를 줄여줌으로써 최근 비만 치료제로 허가된 오를리스타트 등이 있다. 그러나, 기존에 사용되어온 약물 중 펜플루라민 등은 원발성 폐고혈압이나 심장 관막병변과 같은 부작용을 일으켜 최근에 사용이 금지되었으며, 다른 약물들도 혈압감소나 유산산혈증 등의 문제점이 발생하여 심부전, 신질환 등의 환자에는 사용하지 못하는 문제점이 있다.

<10> 따라서, 부작용이 적으며 보다 나은 비만 치료 및 예방법을 찾기 위하여 지방세포분화 억제제를 탐색하게 되었다. 즉, 지방세포의 형성 과정에 밀접한 관련이 있으나 신경계에 작용하지 않을 가능성이 높은 새로운 약물을 검색하고 동정한 것이다.

<11> 지방세포에 저장된 지방은 체내의 중요한 에너지원으로 사용된다. 그러나, 비만이 진행됨에 따라 지방세포는 수적 증가가 일어날 뿐 만 아니라 과다한 지방세포의 분화에 의한 다량의 트리글리세라이드 합성으로 지방세포의 크기증가를 포함한 형태적 변화와 여러 유전자 발현의 변화를 동반한다. 지방세포의 크기증가는 잉여 에너지를 중성지방의 형태로 합성 및 저장함으로써 유도된다. 한편, 지방의 저장에 따라 지방세포의 크기증가는 그 직경이 약 20배까지 늘어날 수 있으며 그 결과 세포 용적은 수천 배까지 증가되는 것으로 알려져 있다. 이러한, 지방세포의 크기는 일반적으로 식사 조절로 가능하지만 새로운 지방전구세포가 지방세포로 분화되는 과정은 식사조절

로는 효과가 없기 때문에 비만의 근본적 치료 또는 억제를 제어하기 위해서는 지방세포의 분화과정을 조절하는 것이 중요하다. 지방세포 분화는 인슐린이나 인슐린 성장인자-I (insulin like growth factor-1), 성장호르몬 등의 자극에 의하여 촉진되며 이 과정에 CCAAT enhancer-binding protein- β (C/EBP β), peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR α) 등의 전사인자들의 증가가 관찰된다. 이들, 전사인자들은 지방세포 조절인자와 더불어 지방세포의 분화를 촉진시키며 Glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH) 나 지방산 생합성효소 (fatty acid synthase) 과 같은 효소들의 발현량이 증가한다.

<12> 그러므로 지방세포의 분화를 저해하여 생성되는 지방세포의 수를 조절하고, 그에 따라 축적되는 여분의 에너지를 조절한다는 아이디어를 바탕으로 하여 지방세포 분화를 저해하는 물질들을 탐색하고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있다.

<13> 일반적으로 새로운 성분의 약제를 개발하기 위한 여러 가지 방법 중에서 기존 약제의 실험적 변형 또는 새로운 물질의 합성과 기능검색은 매우 많은 시간과 투자가 필요하다. 이에 비하여 전통 의학에서 사용되고 있는 천연물 약제들을 이용할 경우 오랫동안 사용되어 왔기 때문에 개발될 약물에 의한 독성 염려가 적다는 장점이 있을 뿐 만 아니라 확인된 약효를 바탕으로 하여 새로운 활성 성분을 발견할 수 있는 가능성이 매우 높다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<14> 이에, 본 발명에서는 단삼에서 추출한 크립토탄시

논 (Cryptotanshinone)이 지방세포의 분화억제 효능이 있음을 확인하였으며 크립토탄시논을 High Fat Diet로 인해 비만을 일으키는 모델동물인 *DIO* 마우스에 처리한 결과 체중감소를 포함한 비만예방과 치료효과를 관찰하였다. 따라서, 단삼에서 추출한 크립토탄시논 (Cryptotanshinone)이 비만예방 및 치료효과가 있음을 확인하고 본 발명을 완성하게 되었다.

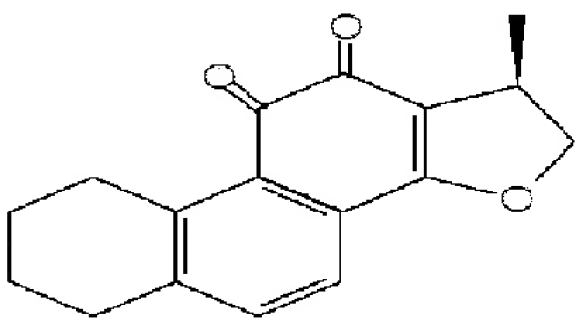
<15> 따라서, 본 발명은 지방세포인 3T3-L1 과 F442A 세포의 분화를 저해하는 활성을 통해 비만 예방 및 치료효과가 있는 크립토탄시논을 유효성분으로 함유하는 비만 예방 및 치료제 조성물을 제공하는데 그 목적이 있다.

【발명의 구성 및 작용】

<16> 본 발명은 다음 화학식 1로 표시되는 크립토탄시논 (Cryptotanshinone)과 약제학 적으로 허용 가능한 담체를 함유하는 비만 예방 및 치료 조성물을 그 특징으로 한다.

<17> 화학식 1

<18>



<19> 이와 같은 본 발명을 더욱 상세하게 설명하면 다음과 같다.

- <20> 본 발명은 비만 예방 및 치료에 유효한 조성물로 특히 지방세포의 분화 억제 효과를 나타내는 상기 화학식1로 표시되는 크립토탄시논을 유효성분으로 함유하는 비만 예방 및 치료 조성물에 관한 것이다.
- <21> 본 발명이 유효성분으로 사용하는 상기 화학식 1로 표시되는 크립토탄시논은 생약제인 단삼을 주원료로 추출할 수 있다. 이러한 추출방법은 통상적인 것으로, 먼저 메탄올로 추출하여 감압 농축한 후, 메틸렌 클로라이드로 재추출하여 얻어진 농축 용액을 실리카 칼럼 크로마토그래피로 정제함으로써 순수한 크립토탄시논을 얻는다.
- <22> 상기 화학식 1로 표시되는 크립토탄시논은 지방세포분화를 억제하여 체내에 지방세포의 증식을 억제함과 동시에 지방세포의 수를 조절하고, 그에 따라 축적되는 여분의 에너지를 조절함을 통하여 비만을 치료하게 된다.
- <23> 이에, 본 발명에서는 생리활성이 부여된 크립토탄시논에 대하여 지방세포 (3T3-L1 과 F442A cell) 분화 억제에 대해 활성을 측정하였으며, 그 결과 이들 화합물이 우수한 저해 활성을 보임을 확인할 수 있다. 또한, 크립토탄시논의 비만예방 및 치료효과를 High Fat Diet로 인해 비만을 일으키는 모델동물인 *DIO* 마우스에서 비만예방 및 치료 관련 생체내 실험을 통하여 확인한 결과 매우 우수한 효과가 있음을 확인할 수 있다.
- <24> 따라서, 상기 화학식 1로 표시되는 크립토탄시논이 유효성분으로 함유되어 있는 비만 예방 및 치료 조성물은 지방세포분화 억제를 통하여 비만을 예방 및 치료할 수 있음으로 인하여 비만과 관련된 각종 질병에 대한 다양한 약제로의 개발이 가능하리라 사료된다. 본 발명에 따른 비만 예방 및 치료 조성물은 상기 화학식 1로 표시되는

크립토탄시논을 유효성분으로 함유하고, 여기에 약제학적으로 허용 가능한 담체와 함께 필요에 따라 비만 예방 및 치료제로 제조할 수 있다.

<25> 본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 본 발명의 비만 예방 및 치료제의 약학적 조성물은 상기 크립토탄시논을 유효 성분으로 함유한다. 상기 크립토탄시논은 임상 투여 시에 경구 또는 비경구로 투여가 가능하며 일반적인 의약품 제제의 형태로 사용될 수 있다. 즉, 본 발명의 크립토탄시논은 실제 임상 투여 시에 경구 및 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있는데, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제 및 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구 투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제 및 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 크립토탄시논에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스, 락토오스 및 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 및 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제 및 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제 및 좌제가 포함된다. 비수성용제와 현탁용제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될

수 있다. 좌제의 기재로는 위텡솔 (witepsol), 마크로골, 트윈 (tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤 및 젤라틴 등이 사용될 수 있다.

<26> 투약 단위는, 예를 들면 개별 투약량의 1, 2, 3 또는 4배를 함유하거나 또는 1/2, 1/3 또는 1/4배를 함유할 수 있다. 개별 투약량은 바람직하기로는 유효 약물이 1회에 투여되는 양을 함유하며, 이는 통상 1일 투여량의 전부, 1/2, 1/3 또는 1/4배에 해당한다. 크립토탄시논의 유효용량은 농도 의존적이나 바람직하게는 0.1mg 내지 1g/kg이고, 더욱 바람직하기로는 0.4 내지 200 mg/kg이며, 하루 1-6 회 투여할 수 있다.

<27> 또한, 본 발명은 크립토탄시논을 유효성분으로 함유하는 비만 예방 및 치료용 건강식품 조성물을 제공한다.

<28> 본 명세서에서 건강식품이란 일반 식품에 크립토탄시논을 첨가함으로써 일반 식품의 기능을 향상시킨 식품이며, 크립토탄시논을 일반식품에 첨가하거나, 캡슐화, 분말화, 현탁액 등으로 제조할 수 있다. 이를 섭취할 경우 건강상 특정한 효과를 가져오고, 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하였기 때문에 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있다.

<29> 본 발명의 크립토탄시논을 식품 첨가물로 사용할 경우, 상기 크립토탄시논을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용되고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 그의 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 크립토탄시논을 식품 또는 음료의 제조 시에 원료에 대하여 0.0001 내지 10 중량%, 바람직하게는 0.1 내지 5 중량%의 양으로 첨가될 수 있다. 그러나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강

조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하로 조절할 수 있다. 또한, 본 발명의 건강식품은 상기 약학적 조성물로 이용하는 경우는 측정된 독성 범위내의 크립토탄시논을 함유되도록 하는 것이 바람직하다.

<30> 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 크립토탄시논을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있다. 구체적으로, 크립토탄시논을 함유하는 건강식품으로는 크립토탄시논을 주성분으로 만든 즙, 차, 젤리, 주스 등의 건강식품 및 기호품을 들 수 있으며, 부종, 신장염, 요도염 등을 목적으로 하는 민간요법제 등을 들 수 있다.

<31> 이하, 본 발명을 다음의 실시예에 의거하여 더욱 상세히 설명하겠지만 본 발명의 범위가 다음 실시예에 한정되는 것은 아니다.

<32> 실시예 1: 크립토탄시논의 분리

<33> 단삼 (*S. miltiorrhza*) 은 안동의 한약재상에서 구입 (5 kg) 하여 재료로 사용하였으며, 그 이외의 재료들은 약재상에서 구입하거나 채집하였다. 단삼은 메탄올 50 ℓ 로 24 시간 용출시킨 후 감압 농축하였다. 여기에, 물 1500 ml를 첨가하고 동량의 n-헥산, 디클로로메탄 (CH₂Cl₂), 에틸아세테이트 (EtOAc) 를 넣어 차례로 2회 반복 추출하여 겔 (gel) 상태의 붉은색 추출물을 얻었다. 각각의 층을 대상으로 활성을 검증한 결과 디클로로메탄 층에서 활성이 가장 높았다.

<34> 실리카 겔[Merck. Kieselgel 60, 230~460 mesh]을 100% n-헥산으로 충분히 스웰링 (swelling)한 후 칼럼 (5×35 cm)에 패킹 (packing)하였다. 여기에 CH₂Cl₂ 층에서 얻은 50 g의 추출물을 소량의 EtOAc와 n-헥산에 녹여서 시료를 로딩 (loading)하였다. 시료 로딩 후 충분히 용출시킨 다음 EtOAc를 10 ~ 20%로 용출하고, MeOH/CHCl₃ = 0/100 (v/v) → 50/50 (v/v)으로 단계적 용출하여 크립토텐시논을 얻었다. 지방세포의 분화억제를 통하여 활성 분획을 모아 감압 농축하였다.

<35> 첫 번째 칼럼에서 활성을 보인 물질을 다시 실리카 겔[Mecrk. Kieselgel 60, 230~460 mesh]을 이용하여 분리하였다. 100% n-헥산으로 스웰링 (swelling)한 후, 칼럼 (4×25 cm)에 패킹 (packing)하였다. EtOAc/n-헥산 = 0/100 (v/v) → 20/80 (v/v)을 전개용매로 사용하여 얻었다. 저해활성 분획을 모아 감압 농축하였다.

<36> 그런 다음, EtOAc/n-헥산 = 30/70 (v/v) 전개용매 하에서 Prep-TLC를 수행하였다. 각 단계에서 TLC를 수행하여 각 분획의 분리 정도를 관찰하고 전개용매는 노말 페이스 (normal phase)에서 EtOAc/n-헥산 = 80/20 (v/v)을 사용하였다. 각 물질의 검색은 아니스알데하이드 염색 용매 (5% H₂SO₄, 2.5% 아세트산, 5% 아니스알데하이드, 87.5% 에탄올)를 사용하여 TLC 플레이트 (plate)를 핫 플레이트 (hot plate)에서 가열하여 발색시켰다. 이상과 같은 방법으로 저해물질을 추출하고 분리 정제하였다.

<37> **실시예 2: 분리된 활성물질의 구조분석**

<38> 상기 실시예 1에서 분리한 크립토텐시논의 구조를 결정하기 위하여 분자량 및 핵자기 공명 (NMR) 분석을 수행하였다.

<39> (1) 분자량 분석

<40> 질량분석기를 이용하여 고해상도 질량분석을 행한 결과, 합성된 크립토펜시논의 분자량은 296이고 분자식은 $C_{19}H_{20}O_3$ 인 것으로 판명되었다.

<41> EI-MS (m/z) : 296 (M^+) , 268 (M^+-CO) , 253

<42> (2) 핵자기공명 (NMR) 분석

<43> 1H -NMR ($CDCl_3$) : δ 7.42 (2H, ABq, $J=8.0$ Hz) , 4.83 (1H, t, $J=9.2$ Hz) , 4.31 (1H, dd, $J=9.2$ and 6.0 Hz) , 3.55 (1H, m) , 3.17 (2H, br t) , 1.65 (4H, m) , 1.40 (3H, d, $J=6.8$ Hz) , 1.28 (6H, s)

<44> ^{13}C -NMR ($CDCl_3$) : δ 9.58 (C-1) , 19.00 (C-2) , 37.73 (C-3) , 34.76 (C-4) , 143.57 (C-5) , 132.48 (C-6) , 122.43 (C-7) , 128.30 (C-8) , 126.19 (C-9) , 152.28 (C-10) , 184.16 (C-11) , 175.59 (C-12) , 118.21 (C-13) , 170.66 (C-14) , 81.38 (C-15) , 34.54 (C-16) , 18.74 (C-17) , 31.85 (C-18) , 31.80 (C-19)

<45> (3) 물리화학적 성질

<46> 크립토펜시논의 물리화학적 성질은 다음 표 1과 같다.

<47> 외형: 오렌지분말

<48> 분자식: $C_{19}H_{20}O_3$

<49> 분자량 : 296

<50> 융점 : 190-192도

<51> 가용성 : 메탄올, DMSO

<52> 불용성 : 물

<53> 실시예 3 : 지방세포 분화 저해활성 측정

<54> 지방전구 세포인 3T3-L1 과 F442A 세포를 10% bovine calf serum이 들어있는 DMEM에서 세포배양 한다. 지방전구세포가 세포배양 시 밀도가 약 90% 가량 되면 3T3-L1의 경우 Dexamethasone, IBMX, 인슐린 등을 48 ~ 55시간 정도 처리하여 지방 세포분화를 유도하며, 이어 매 2일마다 세포 배양액을 fetal calf serum과 인슐린이 든 배양액으로 치환한다. F442A 세포의 경우 지방전구세포가 세포 배양시 약 90%정도의 밀도를 보일 때 10%의 fetal calf serum과 인슐린이 포함된 배양액으로 바꾸어 주고 매 2일마다 세포배양액을 갈아주고 지방세포의 분화를 유도한다. 지방세포분화 저해활성의 측정은 단삼에서 추출한 크립토탄시논 (Cryptotanshinone)을 지방세포분화 유도의 초기단계부터 5 μ g/ml의 농도로 처리하여 대조군과 비교해 나간다. 90%이상의 세포가 지방세포로 분화하기까지는 약 12 ~ 15일 정도가 걸리며, 각각의 분획물의 활성은 대조군과 같은 시기까지 처리하여 그 효능을 관찰하고 현미경사진을 촬영하여 관찰하였다.

<55> 그림 1은 지방세포분화 유도시기에 따라 대조군과 단삼 추출물 그리고 단삼에서 추출한 크립토탄시논 (Cryptotanshinone) 사이의 지방세포분화 능력을 비교한 것이다.

대조군의 경우 80 ~ 90%의 F442A세포가 지방세포로 분화하는데 까지 약 11일이 걸린 반면, 단삼 추출물과 단삼에서 추출한 크립토탄시논 (Cryptotanshinone)은 분화초기 단계에서부터 각각 50mg/ml과 5 ug/ml 농도로 처리하였을 경우 동시기에 각각 5 ~ 10% 이하의 세포만이 지방세포로 분화하였다.

<56> **실시에 4 : 비만 모델 동물인 DIO 마우스에서 비만예방 및 치료효과 검증**

<57> DIO 마우스는 C57BL/6 male 동물 생후 4 주령 후 Research Diets사 D12451, 45%kcal 지방사료를 급여한다.

<58> 그 결과, 지방이 체내에 과도하게 축적되며 이로 인하여 출생 후 약 3개월 정도가 되면 일반적인 마우스 체중의 1.4배에 달하는 31~32g 이상을 유지하게 된다. 따라서, 비만 예방 및 치료 효과를 알아보기 위하여 체중이 31~32g 이상되는 3개월령의 DIO 마우스 16 마리를 대상으로 하였다. 실험군 8 마리에는 단삼에서 추출한 크립토탄시논 (Cryptotanshinone)을 DW에 희석하여 50 mg/kg 농도로 1일 1회씩 4주 동안 일정한 시간에 구강으로 투여하였으며, 대조군 8마리의 경우에는 동일량의 DW만을 투여하였다. 투여 4주 후에 실험군과 대조군의 체중을 측정하여 분석한 결과, 대조군의 체중 (33.2 ± 1.7 g)과 비교하여 크립토탄시논을 투여한 실험군의 체중이 약 12.7% 정도 유의하게 ($p < 0.01$) 낮은 수준 (29.7 ± 0.9 g)을 보여 비만을 예방 및 치료하는 것을 관찰할 수 있었다.

<59> **실시에 5 : 정제의 제조**

<60> 크립토탄시논	600 g
<61> 아르기닌	240 g
<62> 결정셀룰로오스	140 g
<63> 스테아르산 마그네슘	10 g
<64> 하이드록시프로필메칠셀룰로오스	10 g

<65> 실시예 6 : 분말제의 제조

<66> 크립토탄시논	10 g
<67> 옥수수 전분	50 g
<68> 카르복시 셀룰로오스	40 g
<69> 총 량	100 g

<70> 상기에서 나열된 성분들을 잘게 부쇄 혼합하여 분말을 제조하였다. 젤라틴으로 이루어진 경질 캡슐에 분말 500 mg을 넣어 캡슐제를 제조하였다.

<71> 실시예7. 크립토탄시논의 우유에의 적용

<72> 우유	99g
<73> 크립토탄시논	1g

<74> 실시예8. 단삼 추출물의 오렌지쥬스에의 적용

<75> 액상과당	-----5%
<76> 폴리덱스트로스	-----1%
<77> 구연산	-----5%
<78> 비타민C	-----0.02%
<79> 단삼 추출물	-----2%
<80> 오렌지과즙농축액	-----25%
<81> 물	-----67%

<82> **실시예9...** 음료의 제조

<83> 젯산칼슘	50 mg
<84> 구연산	5 mg
<85> 니코틴산아미드	10 mg
<86> 엽산리보플라빈나트륨	3 mg
<87> 엽산피리독신	2 mg
<88> 아르기닌	30 mg
<89> 크립토탄시논	100 mg
<90> 물	200 ml

【발명의 효과】

<91> 상기에서 설명한 바와 같이, 본 발명의 크립토펜시논은 지방세포의 분화를 억제하는 물질로 유효하므로, 크립토펜시논은 비만 예방 및 치료제 조성물의 유효성분으로 유용하다.

<92> 또한, 크립토펜시논은 지방세포의 분화를 억제함으로써 지방의 세포의 증식을 억제하여 지방세포의 수를 조절하므로 비만으로 인하여 발생하는 각종 질병들을 예방하거나 치료할 수 있는 식품, 화장품, 의약품 조성물로 개발될 수 있다.

【특허청구범위】

【청구항 1】

하기 화학식의 크립토탄시논 (cryptotanshinone) 을 유효성분으로 하여 치료 및 / 또는 예방적 유효량 이상을 함유하는 비만 예방 및 / 또는 치료용 조성물

【청구항 2】

단삼 (*S. miltiorrhza*) 추출물을 유효성분으로 하여 치료 및 / 또는 예방적 유효량 이상을 함유하는 비만 예방 및 / 또는 치료용 조성물

【청구항 3】

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상기 조성물은 지방세포 분화 억제활성을 나타내는 것임을 특징으로 하는 조성물

【청구항 4】

제 3 항에 있어서, 상기 지방세포는 3T3-L1 또는 F442A 세포인 것을 특징으로 하는 조성물

【청구항 5】

제 1 항 내지 제 4 항에 있어서, 상기 조성물은 하나 이상의 약제학적으로 허용되는 담체 또는 부형제를 포함하는 것임을 특징으로 하는 비만 예방 및 / 또는 치료용 조성물

【청구항 6】

제 5 항에 있어서, 유효성분의 함량이 성인 체중 1Kg 당 0.1 ~ 6,000 mg/일 범위로 투여됨을 특징으로 하는 조성물

【청구항 7】

제 5 항의 조성물을 포함하는 비만 예방 및/또는 치료용 제제

【청구항 8】

제 7 항에 있어서, 상기 제제는 적어도 하나 이상의 약제학적으로 허용되는 담체 또는 부형제를 포함하는 것임을 특징으로 하는 제제

【청구항 9】

제 7 항 또는 제 8 항에 있어서, 상기 제제는 정제, 산제, 경질 또는 연질의 캡셀제, 현탁제, 주사용 제제, 유화액, 비경구 투여용의 단위 투여형 또는 수회 투여형 인 것임을 특징으로 제제

【청구항 10】

제 1 항 내지 제 4 항에 있어서, 상기 조성물은 식용음료 또는 식품의 형태로서 제제학적으로 허용되는 부형제를 추가로 포함하는 것임을 특징으로 하는 비만 예방 및/또는 치료용 조성물

【청구항 11】

제 10 항에 있어서, 유효성분의 함량이 0.0001 내지 10 중량% 범위로 포함됨을 특징으로 하는 조성물

【청구항 12】

단삼 (*S. miltiorrhza*) 으로부터 a) 물 또는 유기용매 추출하여 조 추출액을 얻는 단계 b) 상기 조 추출물을 여과한 후 (감압)농축하는 단계 및 c) 선택적으로, 용매를 제거하는 단계를 포함하는 단삼 추출물 또는 크립토탄시논 (cryptotanshinone) 의 제조 방법

【청구항 13】

제 12 항에 있어서, 상기 단삼은 건조약재 또는 생약재인 것임을 특징으로 하는 제조 방법

【청구항 14】

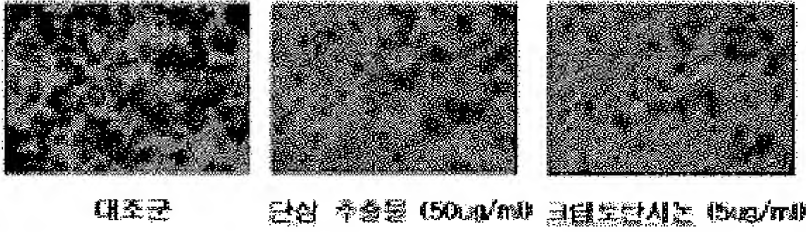
제 12 항 또는 제 13 항에 의해 제조된 단삼 추출물을 유효성분으로 함유하는 것임을 특징으로 하는 비만 예방 또는 치료용 조성물

【청구항 15】

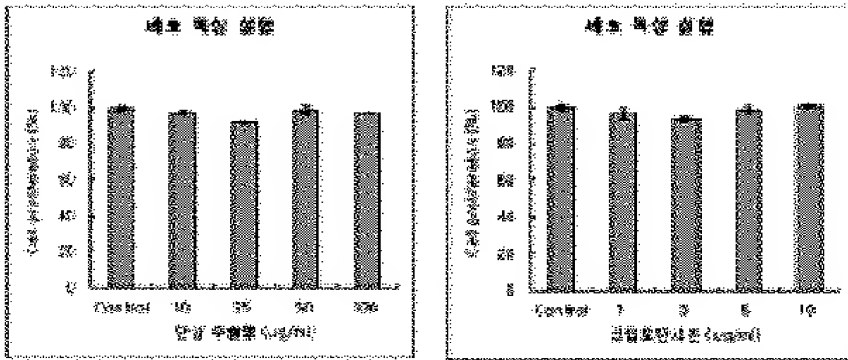
제 12 항 내지 제 13 항 중 어느 한 항의 제조방법에 의해서 제조된 비만 예방 및 치료 활성 분획물

【도면】

【도 1】



【도 2】



【도 3】

